Der Einfluß von Tabakrauchbestandteilen auf den Tryptophanstoffwechsel

Helmut Grumbach

1968

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. E. Werle

Der Einfluß von Tabakrauchbestandteilen auf den Tryptophanstoffwechsel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Helmut Grumbach
aus Schwabach

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doz. Dr. H. Schievelbein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.Dr. E. Werle
Dekan:	Prof. Dr. F. Marguth
Tag der mündlichen Prüfung:	15. 10. 1968

Der Einfluß von Tabakrauchbestandteilen auf den Tryptophanstoffwechsel

Helmut Grumbach

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0032

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) E i n l e i t u n g	1
B) P r o b l e m s t e l l u n g	4
C) M e t h o d i k	5
I Untersuchungen über die Kynureninase	5
1. Kynureninase aus Rattenleber	6
1.1 Aktivität der Kynureninase aus Rattenleberhomogenat	6
1.2 Einfluß von Rauchkondensat auf die Kynureninase	6
1.3 Einfluß von Nikotin auf die Kynureninase	7
1.4 Aktivität der Kynureninase nach Berauchung in vitro	7
1.4.1 Wirkung von ungefiltertem Rauch	8
1.4.2 Wirkung verschiedener Filter	8
1.4.3 L-3-Hydroxykynurenin als Substrat der Kynureninase	9
1.5 Einfluß des im Zigarettenrauch enthaltenen Cyanwasserstoff auf die Kynureninaseaktivität	10
1.5.1 Hemmung der Kynureninase durch Zusatz von KCN zum Homogenat	10
1.5.2 Aufnahme von Cyanwasserstoff im Homogenat nach Berauchung	10
1.5.3 Wirkung von Rhodanid auf die Kynureninaseaktivität	11
2. Kynureninase aus Rattennieren	12
2.1 Aktivität der Kynureninase aus Nierenhomogenat	12
2.2 Einfluß von Cyanid auf die Kynureninase	12
3. Kynureninase aus Hamsterleber	12
3.1 Aktivität der Kynureninase aus Lebern von berauchten Hamstern	12
3.2 Einfluß von Prednisolon auf die Aktivität der Kynureninase	13
3.2.1 in vitro Untersuchungen	13
3.2.2 in vivo Untersuchungen	13

II Untersuchungen über die Tryptophanpyrrolase 14

1. Tryptophanpyrrolase aus Rattenleber 14
1.1 Aktivität der Pyrrolase nach in vitro Berauchung 14
1.1.1 mit ungefiltertem Rauch 14
1.1.2 mit verschiedenen Filtern 15
1.2 Einfluß von Cyanid auf die Pyrrolaseaktivität 15

2. Tryptophanpyrrolase aus Hamsterleber 15
2.1 Aktivität der Pyrrolase nach in vivo Berauchung 15

D) E r g e b n i s s e 16

I Untersuchungen über die Kynureninase 16

1. Kynureninase aus Rattenleber 16
1.1 Aktivität der Kynureninase aus Rattenleberhomogenat 16
1.2 Einfluß von Rauchkondensat auf die Kynureninase 16
1.3 Einfluß von Nikotin auf die Kynureninase 16
1.4 Aktivität der Kynureninase nach Berauchung in vitro 16
1.4.1 Wirkung von ungefiltertem Rauch 16
1.4.2 Wirkung verschiedener Filter 19
1.4.3 L-3-Hydroxykynurenin als Substrat der Kynureninase 21
1.5 Einfluß des im Zigarettenrauch enthaltenen Cyanwasserstoff auf die Kynureninaseaktivität 21
1.5.1 Hemmung der Kynureninase durch Zusatz von KCN zum Homogenat 21
1.5.2 Aufnahme von Cyanwasserstoff im Homogenat nach Berauchung 22
1.5.3 Wirkung von Rhodanid auf die Kynureninaseaktivität 25

2. Kynureninase aus Rattennieren 25
2.1 Aktivität der Kynureninase aus Nierenhomogenat 25
2.2 Einfluß von Cyanid auf die Kynureninase 26

3. Kynureninase aus Hamsterleber 26
3.1 Aktivität der Kynureninase aus Lebern von berauchten Hamstern 26
3.2 Einfluß von Prednisolon auf die Aktivität der Kynureninase 28

II Untersuchungen über die Tryptophanpyrrolase 30

1. Tryptophanpyrrolase aus Rattenleber 30

1.1. Aktivität der Pyrrolase nach in vitro Berauchung 30

1.1.1 mit ungefiltertem Rauch 30

1.1.2 mit verschiedenen Filtern 31

1.2 Einfluß von Cyanid auf die Pyrrolase-aktivität 32

2. Tryptophanpyrrolase aus Hamsterleber 33

2.1 Aktivität der Pyrrolase nach in vivo Berauchung 33

E) D i s k u s s i o n 34

I Zur Methodik 34

II Zu den Ergebnissen 35

F) Z u s a m m e n f a s s u n g 37

G) L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s 39

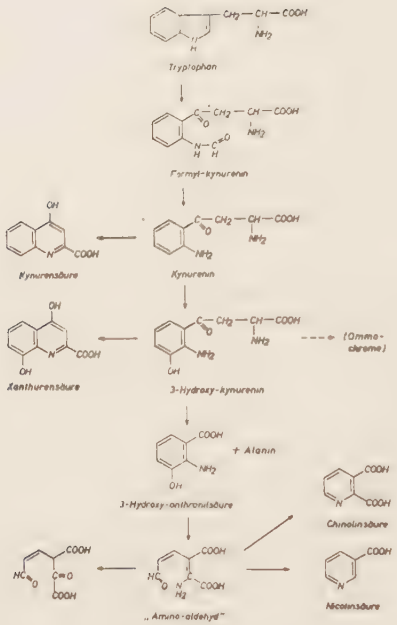
Lebenslauf

A) Einleitung

Verglichen mit Tumoren anderer Organe, zeigen Blastome der Blase eine recht geringe Morbidität. Für die biochemische Forschung sind sie jedoch besonders interessant, weil bei ihrer Entstehung bekannte chemische Substanzen eine Rolle spielen könnten. Den ersten Hinweis auf diese chemische Carcinogenese lieferte REHN (1), der bei 3 von 45 Arbeitern einer Anilinfarbenfabrik in Frankfurt über das Auftreten von Blasenkrebs berichtete. CASE (2) stellte fest, daß die Sterblichkeitsziffer an Blasenneoplasmen bei Beschäftigten der chemischen Industrie in England zwischen 1921 und 1950 dreißig Mal höher war als bei nicht exponierten Kontrollpersonen. Als Entstehungsursachen von Blasentumoren wurden aromatische Amine wie Anilin, Benzidin, 1-Naphthylamin und 2-Naphthylamin gefunden, und CLAYSON, JULL und BONSER (3) konnten durch Implantation von 2-Amino-1-Naphthol in die Blasenschleimhaut von Ratten Krebs hervorrufen. Bald wurde erkannt, daß die erwähnten Amine nicht unmittelbar wirken, sondern im Organismus erst gegiftet werden: durch Hydroxylierung in ortho-Stellung werden die eigentlichen Cancerogene gebildet, die, im Harn gelöst, zur Wirkung kommen.(4). Dieser Befund lenkte das Interesse auf den Abbauweg des Tryptophans, in dessen Verlauf Substanzen mit o-Aminophenolkonfiguration auftreten: 3-Hydroxy-Kynurenin, 3-Hydroxy-Anthranilsäure und 2-Amino-3-Hydroxyacetophenon (Abb.1).
Diese Metabolite erzeugen bei Mäusen Blasenkrebs, wenn man sie in Paraffinkügelchen suspendiert und in die Schleimhaut implantiert (5,6,7,). Andere Abbauprodukte ohne die erwähnte Struktur, wie 5-Hydroxytryptamin, Kynurensäure und Xanthurensäure erwiesen sich bei diesen Versuchen wirkungslos. Ratten, deren Nahrung 2-Acetaminofluoren zugesetzt wurde, erkrankten bei Tryptophanbelastung wesentlich häufiger an Blasenkrebs als Vergleichstiere. Die erhöhte Ausscheidung von Xanthurensäure bei diesen Tieren berechtigte zu der Annahme, daß bei der Tumorentstehung eine Blockierung im Tryptophanabbau durch 2-Acetaminofluoren causal bedeutsam ist.(8,9).

Abb. 1

Abbau des Tryptophans



Die Vermutung, daß der Harn von Blasencarcinomträgern eine erhöhte Konzentration von Tryptophanmetaboliten mit o-Aminophenolkonfiguration aufweisen könnte, veranlaßte BOYLAND und WILLIAMS (10, 11) zur Untersuchung des Harns dieser Patienten nach oraler Verabreichung von 2 g Tryptophan. Sie fanden eine deutlich höhere Ausscheidung von 3-Hydroxy-Anthranilsäure (5 - 15 mg/l) als bei Gesunden (0 - 6 mg/l).
Die krebserzeugenden Abbauprodukte des Tryptophans werden in der Leber wie andere Aminophenole an Schwefelsäure und Glukuronsäure gekoppelt und in dieser Form durch die Niere ausgeschieden. In der Blase werden sie teilweise durch Sulfatase und Glucuronidase wieder hydrolysiert. BOYLAND (12,13) gelang der Nachweis, daß die Konzentration dieser Enzyme im Harn von

Blasenkrebspatienten erhöht ist, und ein Ansteigen der freien aktiven Verbindungen auch dadurch möglich erscheint.
Mortalitäts- und Morbiditätsziffern aus vielen Ländern zeigen eine langsame, stetige Zunahme von Blasentumoren bei der männlichen Bevölkerung. Nachdem die ursächliche Bedeutung des Tabakrauches bei der Entstehung von Bronchialcarcinomen sehr wahrscheinlich geworden war, lag es nahe, bei malignen Neubildungen anderer Organe ebenfalls eine Beziehung zu chronischem Zigarettengenuß zu vermuten.
HOLSTI und ERMALA (14) wiesen als erste auf den Zusammenhang zwischen Blasenblastomen und Tabakrauchgenuß hin. Sie konnten durch tägliche Tabakkondensatpinselung der Lippen und Mundschleimhäute von Mäusen eines "mixed known strain" bei 10 % der Versuchstiere Krebs, bei 58 % gutartige Papillome der Blase erzeugen. Diese Versuche gaben Anlaß zu einer Reihe von retrospektiven epidemiologischen Studien.
Dabei wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen und unter wechselnden Gesichtspunkten ein höherer Tabakkonsum bei Blasenkrebskranken festgestellt als bei Kontrollpersonen.(15, 16, 17, 18, 19).
Prospektive Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse im wesentlichen. DORN und KAHN (20, 21) verfolgten das Schicksal von 293658 Veteranen der US-Streitkräfte und fanden bei insgesamt 285 Todesfällen an Blasencarcinom eine bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern um das 2,23 bis 3,15-fach erhöhte Sterblichkeit. Dieser Befund wurde gestützt von HAMMOND (22), der ähnliche Feststellungen bei einer gemischten Population von 1 Million Menschen traf. WYNDER (23) und LEMON (24) demonstrierten am Beispiel der amerikanischen "Adventisten vom siebenten Tage", die aus religiöser Überzeugung nicht rauchen, eine geringere Häufigkeit von Blasenkrebs als bei der übrigen Bevölkerung.

B) Problemstellung

Da einerseits zwischen der Erkrankung an Blasentumoren und chronischem Zigarettengenuß ein statistisch gesicherter Zusammenhang besteht, andererseits die krebserzeugende Wirkung der o-Aminophenolmetabolite des Tryptophans auf die Blasenschleimhaut erwiesen scheint, lag es nahe, Tabakrauchbestandteile auf eine mögliche Beeinflussung des Tryptophanabbaus hin zu prüfen.
KERR und Mitarb. (25) untersuchten den Stoffwechsel dieser Aminosaure bei Rauchern ohne Blasenneoplasmen. Sie bestimmten im Harn von 6 Versuchspersonen nach oraler Verabreichung von 50 mg Tryptophan/kg Körpergewicht die Konzentration der Abbauprodukte. Während des Rauchens war bei allen Probanden die Ausscheidung von 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure durchschnittlich um 50% erhöht, während die des Endproduktes N-Methylnikotinamid um 34 % geringer war. 24 Stunden nach Einstellung des Rauchens normalisierten sich die Werte wieder.
Die Autoren vermuten, daß die Bestandteile des Zigarettenrauches den Tryptophanstoffwechsel im Sinn einer vermehrten Bildung oder eines verminderten Abbaus der genannten Substanzen mit o-Aminophenolkonfiguration beeinflussen könnten. Als mögliche Angriffspunkte von Tabakrauchbestandteilen kommen in erster Linie die Enzyme in Frage, welche die erwähnten Tryptophanstoffwechselprodukte metabolisieren.
Am Beispiel der Kynureninase (L-Kynureninhydrolase E.C.3.7.1.3) und der Tryptophanpyrrolase (L-Tryptophan O_2-Oxydoreduktase E.C.1.13.1.12) sollte diese Hypothese geprüft werden.

C) Methodik

I Untersuchungen über die Kynureninase

Bestimmung der Kynureninaseaktivität.

L-Kynurenin und L-3-Hydroxy-Kynurenin bilden die natürlichen Substrate der Kynureninase (26,27). Das Enzym katalysiert den Abbau zu Anthranilsäure bzw. 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Alanin. Anthranilsäure wird nach WISS und WEBER (28) fluorometrisch gemessen und mit Hilfe einer Standardkurve quantitativ bestimmt. Als Enzymquelle dienen Homogenate von Rattenlebern, Rattennieren (Sprague Dawley) und Goldhamsterlebern. Die Organe der durch Bruch der Halswirbelsäule getöteten Ratten werden entnommen, mit vorgekühltem 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,4 im Verhältnis 1:3 verdünnt und fraktioniert homogenisiert. Die Hamsterlebern werden nach Entbluten auf Trockeneis konserviert und entsprechend behandelt. Das Ansatzvolumen beträgt 3 ml : 1 ml der Substratlösung (2,08 mg D,L-Kynurenin/ml 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,4) wird je nach Versuchsanordnung mit wechselnden Mengen des Homogenats versetzt und in einem 25 ml Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln bei 38°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 0,5 ml des Ansatzes abpipettiert und mit $ZnSO_4$-Lösung, NaOH und Wasser auf das 10-fache verdünnt. Der ausgefällte Eiweißanteil wird bei 3500 x g 15 min abzentrifugiert. In 1 ml Überstand ermittelt man nach 1:4 Verdünnung mit 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,0 die Fluoreszens der gebildeten Anthranilsäure; die Werte beziehen sich auf 3 ml Ansatz. Zur Identifizierung des Enzyms werden die in der Literatur angegebenen Hemmstoffe KCN und Isonikotinsäurehydrazid verwendet. Leeransätze ergeben, daß sich im Homogenat keine meßbaren Mengen Anthranilsäure befinden. Die Bestimmung erfolgt in Quarzküvetten, Schichtdicke 10 mm, an einem ZEISS Spektralfluorometer mit 2 Monochromatoren (ZFM 4 C).

1. Kynureninase aus Rattenleber

1.1 Aktivität der Kynureninase aus Leberhomogenat

Man bestimmt den Eiweißgehalt verschiedener Homogenate mit der BIURET-Methode und berechnet die mittlere Enzymaktivität.

1.2 Einfluß von Rauchkondensat auf die Kynureninase

Eine grobe Orientierung über die Wirkung von Bestandteilen der Partikelphase des Rauches ist durch Zusatz von Rauchkondensat zum Ansatz möglich. Zur Gewinnung werden Kühlfallen mit flüssiger Luft oder Aceton bzw. Methanol mit festem Kohlendioxyd als Kältemittel benutzt (29). Die anteilmäßige Zusammensetzung der Partikelphase ist Tabelle 1 zu entnehmen (29).

Tabelle 1

Zusammensetzung der Partikelphase des Zigarettenrauches

Wasser	10 - 20 %
Aliphatische Kohlenwasserstoffe	3 - 5 %
Aromatische Kohlenwasserstoffe	1 %
Carbonylverbindungen	8 - 9 %
Alkohole	5 - 8 %
Ester	1 %
Säuren	8 - 13 %
Basen	1 %
Nikotinalkaloide	6 - 8 %
Phenole	1 - 4 %
Sterine	0,5 - 1 %

Auf den Boden der Erlenmeyerkolben bringt man mit einem Glasstab verschiedene Mengen des Kondensats, die durch Wägung des Kolbens vor und nach Zugabe zu bestimmen sind. 2 ml Homogenat werden mit 1 ml Substratlösung 180 min inkubiert; die Anthranilsäuresynthese wird gegen einen Kontrollansatz ohne Kondensat ermittelt. Nach der Inkubation wird untersucht, ob die pH Werte der Ansätze und der Meßlösungen bezüglich der Kontrollen eine Änderung erfahren haben.

1.3 Einfluß von Nikotin auf die Kynureninaseaktivität

Im Rauchkondensat sind Nikotinalkaloide zwischen 6 und 8 % enthalten. Man prüft die Wirkung von Nikotin auf die Aktivität des Enzyms in 10^{-2} M Konzentration. Dazu wird eine 99 %ige Lösung soweit mit 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt, daß in jeweils 0,2 ml der den Ansätzen zuzusetzenden Stammlösungen der erforderliche Alkaloidgehalt vorliegt. Das Homogenatvolumen wird entsprechend auf 1,8 ml verringert. Der Einfluß von Nikotin auf pH Werte in Ansätzen und Meßlösungen wird stichprobenartig kontrolliert. Nach 180 min Inkubation mißt man die Aktivität der Kynureninase anhand eines Kontrollansatzes, in dem die Nikotinstammlösung durch 0,2 ml des angegebenen Puffers ersetzt ist.

1.4 Aktivität der Kynureninase nach Beräuchung in vitro

Je 20 ml Homogenat werden in einer Gaswaschflasche mit Fritte dem Tabakrauch ausgesetzt und gleichzeitig mit Eiswasser gekühlt. Die Zigaretten sind mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe mit 1 Zug pro min von 2 sek Dauer bis auf eine konstante Tabakstummellänge von 23 mm abzurauchen. Unter diesen Bedingungen entfallen 10 Züge auf die verwendeten Zigaretten von 85 mm Länge und 8 mm Durchmesser. Sie enthalten eine in Deutschland gebräuchliche Mischung aus Orient- und Virginiatabaken. Nach jedem Zug wird die Waschflasche leicht geschüttelt, um eine annähernd gleichmäßige Verteilung des Rauches im Homogenat zu gewährleisten. Man muß prüfen, ob Durchleiten von Luft im gleichen Umfang einen Einfluß auf die Enzymaktivität ausübt. Mit dem Rauch treten geringe Mengen fluoreszierenden Materials in das Homogenat über. In Leerversuchen ohne Substrat wird deren Eigenfluoreszenz unter den für Anthranilsäure festgelegten Meßbedingungen ermittelt und bei den Ergebnissen entsprechen berücksichtigt. Auch muß in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, daß durch die Absorption der fluoreszierenden Rauchbestandteile Quenchingeffekte auftreten. Die Abhängigkeit des pH Wertes von der unterschiedlichen Rauchexposition wird ebenfalls bestimmt.

1.4.1 Wirkung von ungefiltertem Rauch

In mehreren Versuchsreihen werden die Homogenate mit je 1, 3 und zur Orientierung mit 5 und 7 Zigaretten nach der beschriebenen Methode beraucht. Nach kurzem Schütteln pipettiert man 2 ml davon zu 1 ml Kynureninlösung, inkubiert und mißt die Fluoreszenz der gebildeten Anthranilsäure in bestimmten Zeitabständen. Als Kontrollwert dient unberauchtes Homogenat derselben Tiere. Die Ergebnisse sind nach dem T-Test von Student auf ihre statistische Signifikanz geprüft.

1.4.2 Wirkung verschiedener Filter

In den Rauchweg werden verschiedene Filter eingeschaltet, so daß ein Teil der Rauchbestandteile nicht mehr oder in geringerem Ausmaß in das Homogenat gelangen. Die Inhaltsstoffe des Tabakrauches verteilen sich auf eine Gas- und eine Partikelphase (29). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der prozentualen Zusammensetzung der Gasphase (29).

Tabelle 2

Zusammensetzung der Gasphase des Zigarettenrauches (wasserfrei). Anorganische Gase (29)

Stickstoff	73	%
Sauerstoff	10	%
Kohlendioxyd	9,5	%
Kohlenmonoxyd	4,2	%
Wasserstoff	1	%
Edelgase	0,6	%
Ammoniak	0,03	%
Stickoxyde	0,02	%
Cyanwasserstoff	0,16	%
Schwefelwasserstoff	0,004	%

Durch Auswahl geeigneter Filter lassen sich nähere Angaben über die Art der im Rauch enthaltenen Substanzen machen, die das Enzym beeinflussen. Der Kontrollansatz enthält Homogenat, das mit 2 Zigaretten ohne Filter beraucht ist. Zusätzlich wird die Enzymaktivität von unberauchtem Homogenat zum Vergleich

herangezogen. In Leeransätzen bestimmt man den Teil der fluoreszierenden Rauchpartikel, der in den einzelnen Filtern nicht zurückgehalten wird.

1.4.2.1 Cambridgefilter

Die Partikelphase des Rauches ist definiert als der Teil, der von einem Cambridgefilter retiniert wird. Dieser besteht aus Glasfasermaterial mit einem Durchmesser von 45 mm und einer Dicke von etwa 2 mm. Die aufgerauhte Seite ist dem Rauchstrom zuzuwenden. Mit Hilfe eines Verbindungsstückes schaltet man ihn unmittelbar hinter das Zigarettenende in den Rauchweg ein. Nach jeder Zigarette wird er durch einen neuen ersetzt.

1.4.2.2 Kohlefilter

Die Gasphase wird zum größten Teil durch einen Kohlefilter absorbiert (29). Er setzt sich zusammen aus Celluloselagen, zwischen denen kleine Partikel Aktivkohle gelagert sind. In Anordnung und Größe ist er mit den handelsüblichen Zigarettenfiltern vergleichbar.

1.4.3 L-3-Hydroxy-Kynurenin als Substrat der Kynureninase

Im Tryptophanstoffwechsel entstehen die Metaboliten mit o-Aminophenolkonfiguration 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Aus technischen Gründen werden die Versuche mit D,L-Kynurenin als Substrat durchgeführt. Die Verwertbarkeit dieser Ergebnisse unter den im Organismus vorliegenden Verhältnissen muß in Kontrollversuchen mit den natürlichen Abbauprodukten nachgewiesen werden; man folgt dazu der unter 1.1.4.2 beschriebenen Versuchsanordnung. Die Bestimmung der während der Inkubation gebildeten absoluten Menge 3-Hydroxy-Anthranilsäure ist nicht erforderlich, da man aus den jeweils parallel laufenden Kontrollansätzen die Änderung der Enzymaktivität prozentual erfassen kann. Nach 180 min Inkubation vergleicht man die Enzymaktivität von berauchtem und unberauchtem Homogenat.

1.5 Einfluß des im Zigarettenrauch enthaltenen Cyanwasserstoffs auf die Kynureninaseaktivität

1.5.1 Hemmung der Kynureninase durch KCN - Zusatz

KCN ist in der Literatur als Inhibitor der Kynureninase angegeben (30). Man untersucht zunächst das Ausmaß dieser Hemmung unter den vorliegenden Bedingungen für das ungereinigte Enzym. Die Ansätze enthalten KCN in 10^{-3} und 10^{-2} M Konzentration: 1 ml Kynureninlösung und 1,8 ml Homogenat werden mit 0,2 ml Stammlösung von 0,195 mg KCN bzw, 1,95 mg KCN/ml 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,4 auf 3 ml ergänzt. In Leeransätzen wird die Wirkung des KCN auf die Fluoreszenz der Anthranilsäure geprüft. Ferner ermittelt man den Einfluß des basisch reagierenden Salzes auf den pH Wert der Ansätze.

1.5.2 Aufnahme von Cyanwasserstoff im Homogenat nach Berauchung

Im Zigarettenrauch befindet sich Cyanwasserstoff zu einem Anteil von 0,16 % (29), von dem eine meßbare Menge bei der Berauchung im Homogenat aufgenommen wird. Man setzt den Effekt auf die Kynureninaseaktivität duch KCN-Zusatz mit dem durch Rauchexposition ermittelten in Beziehung. Nach Kenntnis der aus dem Rauch im Ansatz aufgenommenen Menge an CN^- Ionen kann man größenordnungsmäßig auf die Beteiligung des Cyanids an der Wirkung von Zigarettenrauchbestandteilen auf das Enzym schließen. Das im Homogenat absorbierte Cyanid wird nach ALDRIDGE (31) spektrophotometrisch bestimmt und mittels einer Standardkurve ausgewertet.

1.5.2.1 Berauchung ohne Filter

Zunächst stellt man den CN^- Gehalt der Ansätze nach Berauchen verschiedener Homogenate mit je 1, 3 und 5 Zigaretten fest und prüft die Dosisabhängigkeit der Ergebnisse von der Rauchexposition.

1.5.2.2 Berauchung mit Kohlefilter

Da sich Cyanwasserstoff vorwiegend in der Gasphase befindet, interessiert die vergleichende CN^- Ionenaufnahme nach Berauchung mit filterlosen Zigaretten und nach Zwischenschaltung des Kohlefilters. Die Absorption durch Cambridgefilter spielt in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle.

1.5.3 Wirkung von Rhodanid auf die Kynureninaseaktivität

Cyanid wird im Organismus durch das Enzym Rhodanese zu Rhodanid umgesetzt (32). Es ist nicht zu erwarten, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen (ohne Schwefelzusatz) nennenswerte Mengen von CN^- Ionen in SCN^- Ionen überführt werden, und die Ergebnisse über den Einfluß von Cyanid auf die Kynureninase verfälscht erscheinen. Unter den Verhältnissen des Organismus ist eine Beziehung dieser Reaktion mit der Aktivität der Kynureninase eher denkbar. Man untersucht daher die Wirkung von SCN^- Ionen durch Zugabe von KSCN zum Ansatz in 10^{-3} M und 10^{-2} M Konzentration analog der unter Abschnitt 1.5.1 beschriebenen Methode für KCN. Die Stammlösungen enthalten 1,46 mg bzw. 14,6 mg KSCN/ml Phosphatpuffer pH 7,4.

2. Kynureninase aus Rattennieren

2.1. Aktivität der Kynureninase aus Nierenhomogenat

Man inkubiert 2 ml Homogenat mit 1 ml Kynureninlösung, ermittelt die Enzymaktivität und vergleicht sie mit der von Rattenleberkynureninase.

2.2 Einfluß von Cyanid auf die Kynureninase

Die Untersuchung wird bei 10^{-3} und 10^{-2} M CN^- Ionenkonzentration im Ansatz vorgenommen. Die Versuchsanordnung ist dem entsprechenden Abschnitt für Kynureninase aus Rattenhomogenat zu entnehmen.

3. Kynureninase aus Hamsterleber

3.1 Aktivität der Kynureninase aus Lebern von berauchten Hamstern

Die Tiere werden in vivo berauscht [1], und der Einfluß auf die Enzymaktivität geprüft: Goldhamster werden in einem Exsiccator (Vol 17 L) gehalten, in welchen man Rauch aus einer Rauchmaschine kontinuierlich ohne Belüftung einleitet. Der Rauchkopf der Vorrichtung ist mit 30 Zigaretten bestückt. Während der Berauchungsdauer von 4 min sind die Tiere 120 Zügen zu je 35 ml Volumen ausgesetzt. Nach Beendigung der Rauchexposition werden die Hamster sofort durch Entbluten getötet und die entnommenen Lebern auch Trockeneis konserviert und je nach Bedarf homogenisiert. Die Ansätze enthalten 2 ml Homogenat und 1 ml Kynureninlösung. Vor der Messung der Enzymaktivität wird in Leerversuchen festgestellt, ob bei der Berauchung der Tiere meßbare Mengen fluoreszierenden Materials in die Leber übergetreten sind. Mit der Berliner - Blau - Reaktion prüft man den Cyanidgehalt der Lebern von berauchten und unberauchten Tieren. Nach 60, 120 und 180 min wird die gebildete Anthranilsäure bestimmt und die Enzymaktivität berechnet. Zur Kontrolle werden gleichermaßen konservierte Lebern von unberauchten Hamstern eingesetzt.

[1] Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Dontenwill, dem Leiter der wissenschaftlichen Forschungsstelle im Verband der Zigarettenindustrie, für die Überlassung der Lebern von berauchten Hamstern.

3.2 Einfluß von Prednisolon auf die Aktivität der Kynureninase

Es ist möglich, daß die Berauchung der Tiere unter den gegebenen Verhältnissen über eine Stressreaktion die Ausschüttung von NNR-Hormonen hervorruft. GINOULHIAC und TENCONI (33) fanden nach Hypophysektomie der Ratte eine signifikante Erniedrigung der Enzymwirksamkeit. In den folgenden Untersuchungen wird der Einfluß von Prednisolon auf die Kynureninase am Beispiel der Rattenleber in vitro und in vivo bestimmt. Das Hormon liegt als Natriumsalz der Bernsteinsäure in 10 mg - Trockenampullen vor (Solu-Decortin H$^{(R)}$).

3.2.1 in vitro Untersuchungen

In den Ansätzen ist die Prednisolon-Natriumsuccinat-Konzentration 10^{-3} molar. In Leerversuchen wird geprüft, ob das Hormon die Fluoreszenz der Anthranilsäure beeinflußt. Der Kontroll-Ansatz enthält kein Prednisolon. Nach 120 min Inkubation mißt man die Aktivität des Enzyms.

3.2.2 in vivo Untersuchungen

Man löst 20 mg Prednisolon-Natriumsuccinat in 1 ml Macrodex$^{(R)}$ und injiziert 4 Ratten je 1 ml der Lösung intraperitoneal. Der Einfluß auf die Enzymaktivität wird in verschiedenen Zeitabständen nach der Applikation anhand des Kontrollwertes mit Lebern unbehandelter Ratten ermittelt.

II Untersuchungen über die Tryptophanpyrrolase

Bestimmung der Tryptophanpyrrolaseaktivität.

Die Aktivität der Pyrrolase wird nach KNOX und AUERBACH (34) über die Bestimmung des Kynurenins gemessen, das durch die im Überschuß in der Leber vorhandene Kynurenin - Formamidase aus N'- Formylkynurenin gebildet wird. Im Ansatz werden 1 ml 0,2 M Natriumphosphatpuffer mit 0,3 ml L-Tryptophanlösung und 2 mlHomogenat versetzt und mit Wasser auf 4 ml ergänzt. Die als Enzymquellen dienenden Homogenate stammen aus Ratten- und Goldhamsterlebern; sie werden mit den gleichen Methoden wie in Abschnitt I gewonnen und im Verhältnis 1:3 mit 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 verdünnt. Sie sind zu jedem Versuch frisch herzustellen, da auch bei Kühlung von 0° C Aktivitätsverluste zu registrieren sind. Nach der Inkubation bei 38° C unter O_2 und ständigem Schütteln pipettiert man 2 ml 15%ige Metaphosphorsäure zum Ansatz, läßt die Gefäße noch 5 min schütteln und filtriert. 3 ml des Filtrates werden mit 1 ml 1N NaOH neutralisiert. Die Absorption des Kynurenins wird spektrophotometrisch bei 365 nm in Glasküvetten (Schichtdicke 10mm) gegen Wasser als Blindwert gemessen. Die Extinktionsdifferenz zwischen Meßwert und Blindwert (ohne Substrat) ist das Maß für das gebildete Kynurenin, dessen molarer Extinktionskoeffizient unter den angegebenen Bedingungen 4540 beträgt. Eine Extinktion von 0,100 entspricht 36,68 µg Kynurenin in 6 ml Testansatz.
Da die Tryptophanpyrrolase indirekt mitverantwortlich ist für die Bildung von o-Aminophenolen, wird das Homogenat ähnlichen Einflüssen ausgesetzt wie bei den Untersuchungen über Kynureninase.

1 Tryptophanpyrrolase aus Rattenleber

1.1 Untersuchung der Pyrrolaseaktivität nach Berauchung in vitro

1.1.1 Wirkung von ungefiltertem Rauch

Je 20 ml Homogenat werden mit 1/2, 1 und 1 1/2 Zigaretten beraucht. Der Kontrollansatz enthält unberauchtes Homogenat. Allen Versuchen laufen Leerwerte parallel, deren Extinktion gegen Wasser ermittelt und von den zugehörigen Werten für Kynurenin abgezogen werden.

1.1.2 Wirkung verschiedener Filter

Die Homogenate werden mit je 1/2 Zigarette beraucht nach getrennter Zwischenschaltung von Kohle- und Cambridgefilter. Als Vergleichswert dient die Kynureninbildung mit Homogenat, das dem Rauch 1/2 Zigarette ohne Filter ausgesetzt wird. Leerwerte sind für die verschiedenen Filter gesondert zu bestimmen.

1.2 Einfluß von Cyanid auf die Aktivität der Pyrrolase

Die Wirkung von Cyanid auf das Enzym wird in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-3} M im Ansatz (4 ml) untersucht. Die entsprechenden CN^- Ionen sind in je 0,2 ml Stammlösung enthalten. Die Wasserzugabe wird um das gleiche Volumen reduziert. Der Kontrollansatz ist KCN-frei. Nach 120 min Inkubation bestimmt man das gebildete Kynurenin.

2 Tryptophanpyrrolase aus Hamsterleber

2.1 Untersuchung der Pyrrolaseaktivität nach Berauchung in vivo

Zur Aktivierung der Tryptophanpyrrolase ist H_2O_2 nötig, das in frischer Rattenleber in ausreichendem Maße produziert wird (35). In Leberhomogenaten anderer Tiere ist der Zusatz eines H_2O_2 erzeugenden "Enzymsystems" erforderlich, um die volle Aktivität der Pyrrolase zu gewährleisten (36). In den folgenden Untersuchungen liegt die Betonung weniger auf der absoluten, maximal erreichbaren Enzymaktivität, als in der Darlegung eines unterschiedlichen Substratumsatzes unter den Bedingungen der Versuchsanordnung.
Die Homogenate werden aus den Lebern der berauchten und unberauchten Goldhamster hergestellt. Nach 180 min Inkubation mißt man die Kynureninextinktionen und vermindert sie um die Leerwertextinktionen.

D Ergebnisse

I Untersuchungen über die Kynureninase

1 Kynureninase aus Rattenleber

1.1 Aktivität der Kynureninase aus Rattenleberhomogenat

Der durchschnittliche Eiweißgehalt des Rattenleberhomogenats liegt bei 76 mg / ml. Die Kynureninaseaktivität liegt bei 0,66 µg gebildete Anthranilsäure / mg Protein / Stunde.

1.2 Einfluß von Rauchkondensat auf die Kynureninase

Dieser Versuch hat nur orientierende Bedeutung und läßt lediglich eine qualitative Aussage zu, da sich keine genauen Angaben über Art und Menge der im Ansatz wirksam werdenden, unterschiedlich wasserlöslichen Stoffe des Kondensats machen lassen. Vermutlich spielen dabei auch die Größe der Oberfläche des Zusatzes und die Inkubationszeit eine unter unseren Bedingungen nicht exakt verfolgbare Rolle. Bei Inkubation von 180 und 240 min wird das Enzym dosisabhängig zwischen 2 und 30 % gehemmt (Tab.3).

Tabelle 3

Hemmung der Kynureninase aus Rattenleber durch Rauchkondensat

Ansatz 3 ml	geb.Anthranilsäure µg	Inkubationszeit min	Hemmung %
Kontrolle	220	180	-
1,75 mg Kondensat	202	"	8
6,00 mg Kondensat	177	"	16
10,73 mg Kondensat	155	"	30
Kontrolle	265	240	-
0,86 mg Kondensat	260	"	2
3,26 mg Kondensat	235	"	11

Die pH Werte werden nach Ablauf der Inkubation gemessen. Sie fallen mit zunehmender Kondensatmenge und Inkubationszeit von pH 7,43 auf pH 7,20 und weisen auf den sauren Charakter des verwendeten Rauchkondensats hin. Die Fluoreszenz der Anthranilsäure wird durch die Inhaltsstoffe des Kondensats nicht beeinflußt, wie die Leerversuche ergeben.

1.3 Einfluß von Nikotin auf die Kynureninaseaktivität

Nikotin hat in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Fluoreszenz der Anthranilsäure. Die pH Werte der Ansätze steigen kontinuierlich mit zunehmendem Alkaloidgehalt von pH 7,29 im Kontrollansatz auf pH 7,56 bei 10^{-2} molarem Nikotin; sie liegen damit innerhalb des für Rattenleberkynureninase angegebenen Optimums von pH 7,3 - 8,0 (37), sodaß eine Beeinflussung des Enzyms durch pH-Verschiebung unwahrscheinlich ist. In allen Meßlösungen beträgt der pH Wert 7,04. Eine 10^{-3} M Nikotinkonzentration im Ansatz läßt keine Aktivitätsveränderungen für Kynureninase erkennen, während bei einem 10^{-2} M Nikotingehalt die Ergebnisse für Anthranilsäuresynthese nicht signifikant um etwa 6 % erhöht sind.

1.4 Aktivität der Kynureninase nach Berauchung in vitro

1.4.1 Wirkung von ungefiltertem Rauch

Die Homogenate werden dem Rauch einer zunehmenden Tabakmenge ausgesetzt. In Leeransätzen ermittelt man das Ausmaß der Fluoreszenz der in das Homogenat übergetretenen Rauchpartikel: Berauchen mit 1,3,5 und 7 Zigaretten ergeben 0,8 , 2,0 , 4,0 und 6,0 "Fluoreszenzeinheiten", die von den Meßwerten für Anthranilsäure subtrahiert werden. In den folgenden Angaben entspricht "1 Zigarette" etwa 0,81 g verrauchten Tabaks bzw. ein Vielfaches davon.
Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, zeigt sich eine dosisabhängige Hemmung der Kynureninase durch Zigarettenrauch. Nach 180 min Inkubation liegt sie bei 25 % für 1 Zigarette und 49 % für 3 Zigaretten. Die Berauchung mit 5 und 7 Zigaretten ergab noch weitere Hemmwerte. Die pH Werte bezüglich der Kontrollansätze werden durch berauchtes Homogenat nicht verändert. Temperaturschwankungen zwischen 10° und 25° C beeinflussen die Aktivität des Enzyms nicht meßbar. Leitet man den Rauch durch eine Gaswaschflasche ohne Fritte, so erhöht sichder Hemmeffekt um etwa 2 %.

Tabelle 4

Aktivität der Kynureninase nach Berauchung in vitro

Ansatz 3ml	Anthranilsäure µg			Hemmung %
unberaucht	98 ± 3	155 ± 8	204 ± 10	-
1 Zigarette	70 ± 6	118 ± 6	153 ± 10	25
3 Zigaretten	46 ± 3	78 ± 4	105 ± 5	49
Inkubationszeit min	60	120	180	180

Abb.2

Hemmung der Kynureninase durch Zigarettenrauch

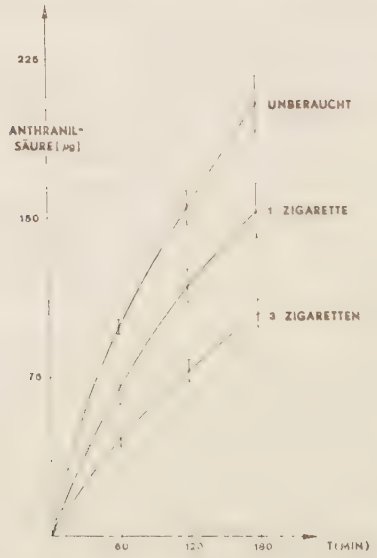


Abb. 2 zeigt den Verlauf der Anthranilsäuresynthese nach der Inkubationszeit. Die Werte für 180 min sind statistisch signifikant ($p < 0{,}0005$). Um zu prüfen, ob die im Ansatz aufgenommenen fluoreszierenden Rauchpartikel einen Quenchingeffekt verursachen, verfährt man folgendermaßen: man beraucht 20 ml Homogenat mit 5 Zigaretten und stellt damit je einen Ansatz mit und ohne Substrat her. Nach 90 min Inkubation wird die Fluoreszenz in der bekannten Weise bestimmt. Anschließend entnimmt man dem Überstand beider Proben nochmals 1 ml, gibt 0,5 ml Anthranilsäurelösung (20 µg/ml Wasser) dazu und füllt mit 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,0 auf 5 ml auf. Damit wird die zusätzliche Anthranilsäurekonzentration von 2 µg/ml Meßlösung erreicht. In beiden Fällensteigt die Fluoreszenz entsprechend an; ein Quenchingeffekt ist somit ausgeschlossen.

1.4.2 Wirkung verschiedener Filter

Um die Wirkung der gebrauchten Filter vergleichen zu können, legt man eine Berauchung mit jeweils gleicher Tabakdosis zugrunde (2 Zigaretten). Die Eigenfluoreszenz der Rauchpartikel ist von der im Homogenat absorbierten Menge und damit von der Art des vorgeschalteten Filters abhängig. Sie beträgt für 2 Zigaretten ohne Filter 1,6 "Fluoreszenzeinheiten", mit Kohlefilter 0,7 "F.E.", mit Cambridgefilter 0,0 "F.E.". Im Kohlefilter wird demnach zusätzlich zur Gasphase ein Teil der Partikelphase zurückgehalten, die ihrerseits vom Cambridgefilter vollständig retiniert wird. Die Leerwerte sind in den Tabellen entsprechend berücksichtigt.
In Tabelle 5 ist die Hemmung des Enzyms durch Zigarettenrauch und die Wirkung verschiedener Filter dargestellt.
Die durch den ungefilterten Rauch von 2 Zigaretten bewirkte Kynureninasehemmung von 42 % wird nach Zwischenschaltung eines Cambridgefilters auf 28 % und mit einem Kohlefilter auf 25 % reduziert. Dies entspricht einer Steigerung der Kynureninaseaktivität von 33 % bzw. 41 %. An der Enzymhemmung sind demnach Bestandteile aus beiden Phasen des Rauches beteiligt. Die Hemmung wird durch Kohle- und Cambridgefilter zusammen nicht vollständig aufgehoben; sie geht lediglich auf 26 % der Gesamthemmung durch beide Rauchphasen zurück. Die Ursache hierfür ist darin zu suchen, daß beide Filter einen Teil der Rauchbestandteile passieren lassen.

Tabelle 5

Hemmung der Kynureninase durch Zigarettenrauch (2 Zigaretten) und die Wirkung verschiedener Filter (n = 3)

Ansatz 3 ml	Anthranilsäure µg			Hemmung %
unberaucht	128 ± 6	213 ± 7	281 ± 13	-
beraucht ohne Filter	80 ± 6	122 ± 1	164 ± 4	42
beraucht mit Cambridgefilter	100 ± 6	148 ± 3	201 ± 6	28
beraucht mit Kohlefilter	102 ± 6	158 ± 7	210 ± 6	25
Inkubationszeit min	60	120	180	180

Abb. 3

Hemmung der Kynureninase durch Rauch von Zigaretten mit und ohne Filter

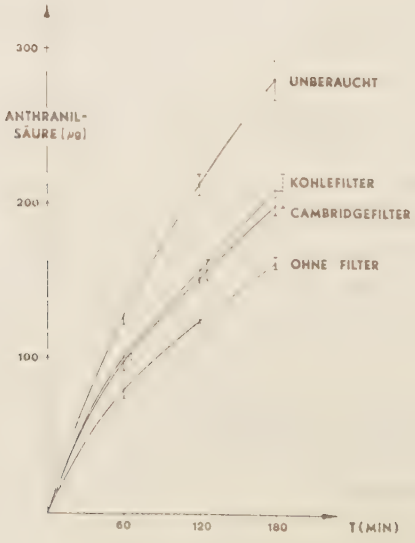


Abb. 3 zeigt, daß die Enzymhemmung bei Verwendung von Kohle- und Cambridgefilter etwa gleich groß ist. Die nach 180 min Inkubation gewonnenen Ergebnisse für die gebildete Anthranilsäure mit unberauchtem Homogenat, Berauchung mit Cambridgefilter und ohne Filter sind signifikant.

1.4.3 L-3-Hydroxy-Kynurenin als Substrat der Kynureninase

3-Hydroxy-Kynurenin ist schwer wasserlöslich in der Konzentration von 2,54 mg/ml 0,066 M Phosphatpuffer pH 7,4. Vor Zugabe des Homogenats wird das Substrat daher im Puffer 30 min bei 38°C geschüttelt und auf diese Weise in Lösung gebracht. Die Hemmung des Enzyms erfolgt durch den Rauch von 2 Zigaretten mit Cambridgefilter. Nach 180 min Inkubation wird im Ansatz mit berauchtem Homogenat durchschnittlich 40 % weniger 3-Hydroxy-Anthranilsäure gebildet als bei der Kontrollbestimmung mit unberauchtem Homogenat (n = 3).

1.5 Einfluß des im Zigarettenrauch enthaltenen Cyanids auf die Kynureninaseaktivität

1.5.1 Hemmung der Kynureninase durch KCN-Zusatz

Um den möglichen Anteil der Kynureninasehemmung durch den im Rauch enthaltenen Cyanwasserstoff beurteilen zu können, wird den Ansätzen zunächst KCN in 10^{-3} und 10^{-2} M Konzentration zugesetzt und die Wirkung auf die Enzymaktivität untersucht. Die Inkubationszeit beträgt bei allen Bestimmungen 120 min. Der pH Wert der Ansätze bewegt sich zwischen pH 7,18 ohne KCN-Zusatz und 7,48 bei 10^{-2} Cyanidkonzentration. Die Fluoreszenz der Anthranilsäure erfährt in dem vorliegenden Meßbereich keine Beeinträchtigung.
Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, wird die Kynureninase aus Rattenleberhomogenat durch CN^- Ionen in 10^{-2} M Konzentration um 70 %, in 10^{-3} M Konzentration um 23 % gehemmt.

Tabelle 6

Hemmung der Kynureninase durch Zusatz von KCN (n = 7)

Ansatz 3 ml	Anthranilsäure µg	Hemmung %
Kontrolle	145 ± 9	-
10^{-3} M CN^- Konzentration	112 ± 9	23
10^{-2} M CN^- Konzentration	43 ± 6	70

1.5.2 Aufnahme von Cyanid im Homogenat

1.5.2.1 Nach Berauchung ohne Filter

Man beraucht verschiedene Homogenate mit je 1, 3 und 5 Zigaretten ohne Filter und mißt nach einer Kontrollbestimmung mit unberauchtem Homogenat die Cyanidaufnahme gegen Wasser als Blindwert. Die Ergebnisse in Tabelle 7 geben den CN^- Ionengehalt in µg/3 ml Ansatz wieder.

Tabelle 7

Aufnahme von CN^- Ionen im Homogenat nach Berauchung mit verschiedenen Tabakmengen (n = 1)

Ansatz 3ml	CN^- Ionenkonzentration µg/3 ml
Kontrolle	0,01
beraucht mit 1 Zigarette	9,60
beraucht mit 3 Zigaretten	25,00
beraucht mit 5 Zigaretten	41,80

Der Kontrollansatz enthält praktisch kein Cyanid. Die CN^- Ionenaufnahme des Homogenats erfolgt dosisabhängig der Rauchexposition, vergleichbar mit der zunehmenden Hemmung der Kynureninase nach Berauchung mit steigenden Tabakmengen.

1.5.2.2 Nach Berauchung mit Kohlefilter

Kohlefilter reduzieren die Enzymhemmung gegenüber ungefiltertem Rauch von 2 Zigaretten um 41 %. Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einfluß des Kohlefilters auf die Cyanidaufnahme im Homogenat nach Berauchung. Um Vergleichsmöglichkeiten mit früheren Versuchen zu schaffen, werden die Homogenate dem Rauch von 3 Zigaretten mit und ohne Kohlefilter ausgesetzt. Der Kontrollwert entspricht dem des vorhergehenden Abschnittes.

Tabelle 8

Aufnahme von CN^-Ionen im Homogenat nach Berauchung von 3 Zigaretten mit Kohlefilter (n = 5)

Ansatz 3 ml	CN^- Ionenkonzentration µg/3 ml
beraucht ohne Filter	25 ± 3
beraucht mit Kohlefilter	5 ± 1

Tabelle 8 zeigt, daß der Kohlefilter etwa 80 % des im Rauch enthaltenen Cyanwasserstoffs absorbiert.
Die beiden folgenden Tabellen geben eine Übersicht eines Teils der bisherigen Ergebnisse über Kynureninasehemmung. Besondere Berücksichtigung findet die Gegenüberstellung der Inhibitorwirkung von Zigarettenrauch und seinem Inhaltsstoff HCN. Tabelle 9 ist zu entnehmen, daß die im Ansatz vorliegenden CN^- Ionen nach ungefilterter Berauchung des Homogenats mit 3 Zigaretten ungefähr 1/3 der im Kontrollversuch erzeugten Cyanidkonzentration von 10^{-3} M beträgt. Die Enzymhemmung nach Rauchexposition ist jedoch doppelt so hoch.

Tabelle 9

Anthranilsäuresynthese, Aufnahme von CN^- Ionen durch Rattenleberhomogenat und Hemmung der Kynureninase

Ansatz 3 ml	Anthranilsäure ug	CN^--Konzentration M	µg	Hemmung %
unberaucht	145 ± 9	-	-	-
unberaucht	43 ± 6	1×10^{-2}	780	70 ± 4
+ KCN	112 ± 9	1×10^{-3}	78	23 ± 6
3 Zigaretten ohne Filter	78 ± 4	$3{,}2 \times 10^{-4}$	25 ± 3	47 ± 4

Tabelle 10

CN^- Ionenkonzentration in Rattenleberhomogenat nach Berauchung und Hemmung der Kynureninase

Ansatz 3 ml	CN^- Konzentration M	µg	Hemmung %
3 Zigaretten ohne Filter	$3{,}2 \times 10^{-4}$	25 ± 3	47 ± 4
3 Zigaretten Kohlefilter	$6{,}6 \times 10^{-5}$	5 ± 1	30 ± 3

Tabelle 10 vergleicht die CN^- Ionenkonzentration im Ansatz nach Berauchung der Homogenate mit 3 Zigaretten ohne Filter und mit Kohlefilter. Letzterer reduziert die Cyanwasserstoffaufnahme auf etwa ein Fünftel, die Hemmung geht um etwa ein Drittel zurück.

1.5.3 Wirkung von Rhodanid auf die Kynureninaseaktivität

Rhodanidionen geben die Farbreaktion nach ALDRIDGE, die zur colorimetrischen Bestimmung von Cyanid im Ansatz angewendet wird. Der Anteil an CN^- Ionen, der bei der Inkubation durch Rhodanese in SCN^- Ionen übergeführt wird, ist mit dieser Methode daher nicht zu erfassen. Eine orientierende Prüfung der Wirkung von Rhodanid auf die Aktivität der Kynureninase ergibt nach 150 min Inkubation eine 10%ige Hemmung des Enzyms erst bei 10^{-2} M SCN^- Ionenkonzentration. Die pH Werte der Ansätze werden durch den Zusatz nicht verändert.

2 Kynureninase aus Rattennieren

2.1 Aktivität der Kynureninase aus Nierenhomogenat

Nach 60, 120 und 180 min Inkubation bestimmt man die im Ansatz gebildete Anthranilsäure (Tabelle 11).
Bei einem durchschnittlichen Eiweißgehalt von 60 mg/ml Homogenat ergibt sich eine Enzymaktivität von 0,117 µg gebildete Anthranilsäure/ mg Protein / Stunde. Sie liegt somit um etwa 82 % niedriger als bei Kynureninase aus Leberhomogenat

Tabelle 11

Aktivität der Kynureninase aus Rattennieren (n = 3)

Inkubationszeit min	Anthranilsäure µg/3 ml
60	21 ± 2
120	29 ± 1
180	35 ± 1

2.2 Einfluß von Cyanid auf die Kynureninaseaktivität aus Rattennieren

Tabelle 12

Hemmung der Kynureninase aus Rattenniere durch Zusatz von KCN (n = 2)

Ansatz 3 ml	Anthranilsäure µg	Hemmung %	Inkubationszeit min
Kontrolle	35	-	180
10^{-3} M CN^- Konzentration	30	14	180
10^{-2} M CN^- Konzentration	12	65	180

Die Hemmbarkeit der Nierenkynureninase durch Cyanid liegt in der gleichen Größenordnung wie die des Leberenzyms; sie beträgt 14 % für 10^{-3} M bzw. 65 % für 10^{-2} M CN^- Ionenkonzentration (Tabelle 12).

3 Kynureninase aus Hamsterleber

3.1 Aktivität der Kynureninase aus Lebern von berauchten Hamstern

Die Aktivität der Kynureninase aus Lebern von unberauchten Tieren beträgt bei einem durchschnittlichen Eiweißgehalt von 42 mg Protein/ ml Homogenat 0,6 µg gebildete Anthranilsäure/mg Protein / Stunde.
Der in Parallelversuchen festgestellte CO-Hb Wert gleichermaßen berauchter Hamster liegt zwischen 40 und 50 %. Der Nikotingehalt der Lungen beträgt 20 - 30 µg/g Gewebe (29). Mit der Berliner-Blau-Reaktion läßt sich nach Verdünnung von 3 ml Homogenat mit 2 ml Wasser und 5 ml Weinsäure nach Überdestillation kein Cyanid nachweisen. Durch die Berauchung treten keine meßbaren Mengen fluoreszierender Rauchbestand-

teile in die Leber über. Man bestimmt die Anthranilsäure nach 60, 120 und 180 min Inkubation.

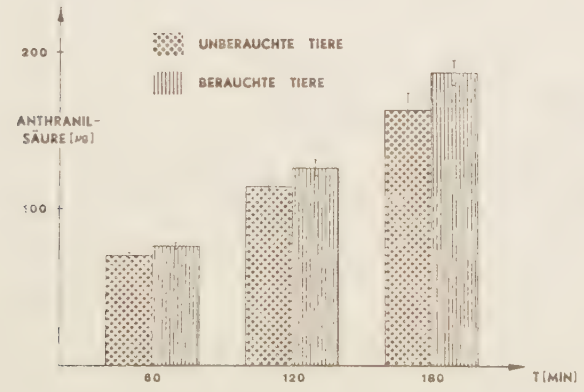
Tabelle 13

Aktivität der Kynureninase aus Hamsterleber nach Berauchung in vivo (n = 7)

Ansatz 3 ml	Anthranilsäure µg		
berauchte Tiere	76 ± 2	126 ± 5	187 ± 8
unberauchte Tiere	70 ± 2	114 ± 6	163 ± 11
Inkubationszeit min	60	120	180
Aktivierung %	9	10	14

Abb. 4

Kynureninaseaktivität in Hamsterlebern nach Berauchung in vivo



Wie aus Tabelle 13 und Abb. 4 hervorgeht, zeigen die Lebern von berauchten Tieren eine höhere Enzymaktivität als die der nicht berauchten Hamster. Der Unterschied der Mittelwerte nach 180 min Inkubation ist statistisch gesichert.($p = 0{,}05$). Die Anthranilsäurebildung ist bei berauchten Tieren mit steigender Inkubationszeit 9 bis 14 % größer als bei den Kontrolltieren.

3.2 Einfluß von Prednisolon auf die Aktivität der Kynureninase

Die Wirkung des Hormons auf die Kynureninase wird in vitro bei einer 10^{-3} M Prednisolonnatriumsuccinat-Konzentration in Ansatz geprüft. Der Kontrollansatz enthält kein Hormon. Bei den in vivo Untersuchungen erhalten 4 Ratten je 20 mg des Prednisolonsalzes, gelöst in 1 ml Macrodex(R), intraperitoneal gespritzt. Die Enzymaktivität wird bei je 2 Tieren 4 bzw. 24 Stunden nach der Injektion ermittelt. Als Kontrollwerte dienen Lebern von unbehandelten Ratten. Sämtliche Ansätze werden 120 min inkubiert. In Leerversuchen wird ein Einfluß von Prednisolonnatriumsuccinat auf die Anthranilsäurebestimmung ausgeschlossen.

Tabelle 14

Aktivität der Kynureninase aus Rattenleber nach Applikation von Prednisolonnatriumsuccinat in vitro und in vivo (n = 2)

Ansatz 3 ml	Prednisolon M/mg	Anthranilsäure µg
Kontrolle	-	156
Hormonzusatz in vitro	10^{-3}	154
i.p.Hormon-injektion	20 mg i.p.	149 4 Std.p.inj.
	20 mg i.p.	159 24 Std.p.inj.

Aus Tabelle 14 kann man entnehmen, daß die Aktivität der Kynureninase durch Prednisolonnatriumsuccinat in 10^{-3} M Konzentration nicht beeinflußt wird. Auch die in vivo Applikation des Hormons ergibt 4 bzw. 24 Stunden post injectionem keine Änderung in der Anthranilsäuresynthese, die außerhalb der normalen Schwankungsbreite liegt.

II Untersuchungen über die Tryptophanpyrrolase

1 Tryptophanpyrrolase aus Rattenleber

1.1 Untersuchung der Pyrrolaseaktivität nach Berauchung in vitro

1.1.1 Wirkung von unverfiltertem Rauch

Nach Berauchen der Homogenate mit je 1/2, 1 und 1 1/2 Zigaretten ohne Filter wird die Aktivität des Enzyms durch Messung des gebildeten Kynurenins nach 120 min Inkubation bestimmt. Der Kontrollansatz enthält unberauchtes Homogenat. Für alle Versuche ist die Leerwertextionktion (ohne Substrat) zu ermitteln, da sie sowohl durch die unterschiedlichen Rauchmengen als auch auf Grund der nicht exakt reproduzierbaren Abrauchbedingungen für vergleichbare Tabakdosen differiert.

Tabelle 15

Aktivität der Tryptophanpyrrolase nach Berauchung in vitro (n = 4)

Ansatz 6 ml	Kynurenin µg	Hemmung %
unberaucht	203 ± 56	-
1 Zigarette	-	100
1/2 Zigarette	36 ± 5	83
Inkubationszeit min	120	120

Tabelle 15 zeigt, daß der Rauch einer Zigarette bereits eine 100 %ige Hemmung des Enzyms bewirkt, so daß sich weitere Versuche mit 1 1/2 Zigaretten erübrigen. Der Aktivitätsverlust nach Berauchung mit 1/2 Zigarette liegt bei 87 %. Die Tryptophanpyrrolase ist somit gegen Hemmstoffe des Tabakrauches erheblich empfindlicher als die Kynureninase.

1.1.2 Wirkung verschiedener Filter

Nach den für Kynureninase gefundenen Ergebnissen interessiert es besonders, ob die Hemmbarkeit der Pyrrolase in einem ähnlichen Verhältnis auf Bestandteile der Gas- und Partikelphase des Rauches zurückzuführen ist.
Die Homogenate sind jeweils mit 1/2 Zigarette zu berauchen, um die isolierte Wirkung von Cambridge- und Kohlefilter vergleichen zu können. Der Kontrollansatz enthält Homogenat, das ungefiltertem Rauch der gleichen Tabakmenge ausgesetzt wird. Über die Leerwertbestimmung gilt das Gleiche wie im vorhergehenden Abschnitt. Die Inkubationszeit beträgt 120 min.

Tabelle 16

Hemmung der Tryptophanpyrrolase durch Zigarettenrauch (1/2 Zigarette) und die Wirkung verschiedener Filter (n = 3)

Ansatz 6 ml	Kynurenin µg	Hemmung %
unberaucht	203 ± 56	-
beraucht ohne Filter	36 ± 5	83
beraucht mit Cambridgefilter	59 ± 11	71
beraucht mit Kohlefilter	149 ± 41	27

In Tabelle 16 ist der Einfluß der verschiedenen Filter dargestellt. Bezüglich der Hemmwirkung von ungefiltertem Rauch geht der Aktivitätsverlust der Pyrrolase nach Zwischenschalten eines Cambridgefilters um 15 % zurück, nach Kohlefiltration jedoch um 67 %. Das heißt, daß ein wesentlich größerer Anteil an der Enzymhemmung auf Bestandteile der Gasphase entfällt, als es für die Kynureninase der Fall ist.

1.2 Einfluß von Cyanid auf die Pyrrolaseaktivität

Der letzte Befund ist Anlaß dafür, die Wirkung von CN^- Ionen bereits ab einer Konzentration von 10^{-6} M zu prüfen. Der Kontrollansatz ist KCN-frei. Die Leerwertextinktionen unterscheiden sich nur minimal. Man bestimmt das Kynurenin nach 120 min Inkubation.

Tabelle 17

Hemmung der Tryptophanpyrrolase durch Zusatz von KCN (n = 2)

Ansatz 6 ml	Kynurenin µg	CN^- Ionenkonzentration M	Hemmung %
Kontrolle	144	-	-
KCN-Zusatz	58	10^{-3}	60
"	91	10^{-4}	37
"	125	10^{-5}	13
"	136	10^{-6}	6

Eine Enzymhemmung von 6 % ist schon bei 10^{-6} M CN^- Ionenkonzentration zu verzeichnen, wie aus Tabelle 17 hervorgeht. Der Aktivitätsverlust bei 10^{-3} M Cyanidkonzentration beträgt etwa 60 % und ist damit vergleichsweise höher als bei Kynureninase.

2 Tryptophanpyrrolase aus Hamsterleber

2.1 Untersuchung der Pyrrolaseaktivität nach Berauchung in vivo

Bei den auf Trockeneis konservierten Organen läßt sich innerhalb von 8 Tagen nach Entnahme kein Aktivitätsverlust feststellen. Die Enzymaktivität von Lebern ungebrauchter Tiere liegt bei 0,21 ug Anthranilsäure / mg Protein / Stunde.

Tabelle 18

Aktivität der Tryptophanpyrrolase aus Hamsterleber nach Berauchung in vivo (n = 6)

Ansatz 6 ml	Kynurenin µg	Inkubationszeit min
unberauchte Tiere	172 ± 10	180
berauchte Tiere	119 ± 5	180

Tabelle 18 ist zu entnehmen, daß sich für die Trytophan-pyrrolase nach Berauchung in vivo eine Hemmung von 31 % gegenüber unberauchten Hamstern ergibt. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die man für Kynureninase aus Lebern berauchter Hamster ermittelt hat.

E) Diskussion

I Methodik

Bei der in vitro Berauchung mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe wird das Zugvolumen nicht gemessen. Man darf jedoch annehmen, daß gleichbleibende Mengen verrauchten Tabaks unter konstanter Zugzahl und Zugdauer vergleichbare Ergebnisse über die verschiedenen Wirkungen im Homogenat ermöglichen. Ferner wird sichergestellt, daß bei der Berauchung auftretende Nebenerscheinungen wie geringe Temperaturschwankungen, pH Wertänderungen und die durch die Gasdurchleitung bedingte Blasenbildung im Homogenat die Enzyme nicht beeinflussen. Unter anderem wird auch das Auftreten von Quenchingeffekten ausgeschlossen.

Im Tabakrauch verteilen sich die Inhaltsstoffe auf eine Gas- und eine Partikelphase. Der relative Anteil einer Substanz ist bestimmt durch den Dampfdruck dieser Substanz, ihrer Konzentration im Rauch und ihrer Affinität zur Partikelphase (29). Aus dieser Definition ist zu erkennen, daß das Vorkommen einer bestimmten Substanz nur in einer der Phasen praktisch nicht zu erwarten ist. Da die Filtration einer großen Reihe von Einflüssen unterliegt, welche von Zug zu Zug durch Änderung z.B. der Länge des als Filter wirkenden Tabakstranges variieren, trifft eine Aussage über die elektive Retention in Filtern auf große Schwierigkeiten. Mit der Absorption des überwiegenden Teils der im Rauch in gasförmigem Zustand vorkommenden Substanzen durch den Kohlefilter ist jedoch zu rechnen. HCN wird nach GRAHAM (29) durch Kohlefilter zu ca 90 % zurückgehalten, während der größte Teil der Partikelphase durch den Cambridgefilter retiniert wird.

Die Untersuchungen über Kynureninase wurden mit D,L-Kynurenin als Substrat durchgeführt, da man bei Anwendung der von WISS und WEBER angegebenen Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität mit 3-Hydroxy-Kynurenin wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit auf technische Schwierigkeiten stößt. In einigen Kontrollversuchen wird bestätigt, daß sich die Ergebnisse über die Kynureninaseaktivität auf die im Organismus vorkom-

menden Metaboliten des Tryptophanstoffwechsels übertragen lassen.

II Ergebnisse

Kynureninase aus Rattenleber wird zu etwa gleichen Teilen durch Bestandteile der Gas- und Partikelphase des Zigarettenrauches gehemmt. Unter unseren Bedingungen hemmen 78 µg CN^- Ionen im Ansatz (3 ml) das Enzym um 23 %. Nach Berauchung des Homogenats mit 3 Zigaretten liegen im Ansatz 25 µg CN^- Ionen vor, die Hemmung beträgt 47 % (Tab.5 und 9). Unter der Voraussetzung, daß analog dem oben erwähnten Befund 25 µg CN^- Ionen eine Hemmung von 8 % verursachen, stellt der im Rauch enthaltene Cyanwasserstoff einen Anteil von etwa 16 % an der Gesamthemmung durch beide Phasen.
Wird der Rauch durch einen Kohlefilter geleitet, so ist die CN^- Ionenaufnahme im Homogenat auf ein Fünftel reduziert gegenüber der Rauchexposition ohne Filter. Die Hemmung der Kynureninase geht jedoch weiter zurück, als es dem retinierten Teil des Cyanids entsprechen würde (Tab.10). Zum Teil ist dies darauf zurückzuführen, daß in der Gasphase noch andere Substanzen an der Inhibitorwirkung auf das Enzym beteiligt sind; andererseits dürfte im Kohlefilter auch ein gewisser Anteil der Partikelphase zurückgehalten werden.
Die Tryptophanpyrrolase ist gegen Hemmstoffe aus Tabakrauch vergleichsweise empfindlicher als die Kynureninase (Tab.15). Außerdem befindet sich der überwiegende Teil der an der Inhibitorwirkung beteiligten Substanzen in der Gasphase; dem entspricht auch die größere Hemmbarkeit des Enzyms durch CN^- Ionen (Tab.16, 17).
Die Aktivität der Kynureninase in der Leber von in vivo berauchten Hamstern ist gegenüber den Kontrollen signifikant gesteigert (Tab.13). Nach der Beobachtung von GINOULHIAC und TENCONI (33) hat Hypophysektomie bei Ratten eine erniedrigte Enzymaktivität zur Folge. Man könnte vermuten, daß die Berauchung der Tiere über eine Stress-Reaktion eine Ausschüttung von NNR-Hormonen induziert und daraus eine Stimulierung des Enzyms resultiert. Prednisolon beeinflußt aber die Aktivität der Kynureninase nicht, so daß über den Mechanismus dieser Aktivitätssteigerung nichts ausgesagt werden kann (Tab.14).

Im Gegensatz zur Kynureninase wird die Tryptophanpyrrolase aus Hamsterleber durch Berauchen in vivo gehemmt.(Tab. 18). Eine Erklärung hierfür ist gegenwärtig ebenfalls nicht möglich.

Aus unseren Versuchen kann man folgern: der Stoffwechsel des Tryptophans wird durch Berauchen in vitro und in vivo beeinflußt. Aus den gemachten Beobachtungen wäre theoretisch u.a. die vermehrte Bildung und ein verminderter Abbau von o-Aminophenolen unter der Wirkung von Tabakrauchbestandteilen denkbar. Die Extrapolation dieser Ergebnisse auf die Verhältnisse beim Menschen ist jedoch nicht zulässig.

Auch kann zunächst kein Schluß auf die Wirkung chronisch zugeführten Rauches auf den Tryptophanstoffwechsel des Menschen gezogen werden.

F) Zusammenfassung

O-Aminophenole rufen im Tierexperiment nach geeigneter Applikation Blasenkrebs hervor. Im Tryptophanstoffwechsel entstehen 2 Metaboliten mit o-Aminophenolkonfiguration: 3-Hydroxy-Anthranilsäure und 3-Hydroxy-Kynurenin. Zwischen dem gehäuften Auftreten von Blasenkarzinom und starkem, chronischem Rauchgenuß besteht ein statistisch gesicherter Zusammenhang. Ferner werden bei Rauchern nach oraler Tryptophanbelastung 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure gegenüber Nichtrauchern vermehrt im Harn ausgeschieden.
Diese Befunde veranlaßten die vorliegende Untersuchung, welche klären sollte, ob Bestandteile des Zigarettenrauches den Tryptophanstoffwechsel im Sinn einer vermehrten Bildung oder eines verminderten Abbaus von o-Aminophenolen beeinflussen können. Die Versuche wurden am Beispiel der Kynureninase und der Tryptophanpyrrolase mit folgenden Ergebnissen durchgeführt:
Kynureninase aus Rattenleber und Rattennieren sowie Tryptophanpyrrolase aus Rattenleber werden durch Zigarettenrauchbestandteilen dosisabhängig gehemmt. Der Aktivitätsverlust von Kynureninase beträgt 49 % nach Berauchung von 20 ml des 1 : 3 verdünnten Homogenats mit 3 Zigaretten; Nikotin ist in 10^{-3} M und 10^{-2} M Konzentration an der Hemmung dieses Enzyms nicht beteiligt.
Tryptophanpyrrolase ist gegen Zigarettenrauch wesentlich empfindlicher: Berauchung mit 1/2 Zigarette setzt die Aktivität um 83 % herab. Untersuchungen durch in vitro Berauchung mit konstanten Tabakmengen ohne Filter, mit Cambridge- und Kohlefilter ergeben, daß sich die Hemmung der Kynureninase zu etwa gleichen Teilen auf die Gas- und Partikelphase des Rauches zurückführen läßt: die Hemmung dieses Enzyms wird gegenüber Berauchung ohne Filter um 33 % bei Zwischenschaltung eines Cambridgefilters, bzw. um 40 % bei Verwendung eines Kohlefilters reduziert. An der Aktivitätsminderung der Tryptophanpyrrolase dagegen sind die Substanzen der Gasphase mit 69 % beteiligt.
Bei der Tryptophanpyrrolase findet man eine wesentlich höhere Aktivitätsabnahme durch CN^- Ionen.

Die Berauchung von Hamstern in vivo führt zu einer Steigerung der Kynureninaseaktivität in der Leber von 14 % (nach 180 min Inkubation), jedoch zu einem Aktivitätsverlust von 31 % für die Tryptophanpyrrolase des gleichen Organs.

Literaturverzeichnis

1) REHN, L. Arch. klin. Chir. 50, 588 (1895)

2) CASE, R.A.M.: The mortality from cancer of the urinary bladder in England and Wales, in: Tumours of the bladder, edited by D.M. Wallace, E. and S. Livingstone, Ltd., London, 1959, p.3

3) CLAYSON, D.B., J.W. JULL and G.M. BONSER: Ibid., 12: 222 (1958

4) SCOTT, W.W., H.L. BOYD: J.Urol. 70, 914 (1953)

5) JULL, J.W.: Brit. J. Cancer 5, 328 (1951)

6) ALLEN, M.J., E. BOYLAND, C.E. DUKES, E.S. HORNING and J.G. WATSON: Brit. J. Cancer 11, 212 (1957)

7) BRYAN, G.T., R.R. BROWN and J.M. PRICE: Ann. N.Y. Acad. Sci. 108, 924 (1963)

8) DUNNING, W.F., M.R. CURTIS and M.E. MAUN: Cancer Res.10, 454 (1950)

9) BOYLAND, E., J. HARRIS and E.S. HORNING: Brit. J. Cancer 8, 647 (1954)

10) BOYLAND, E.,and D.C. WILLIAMS: Biochem. J. 64, 578 (1956a)

11) BOYLAND, E. and D.C. WILLIAMS: 34th Rep. Brit. Emp. Cancer Campgn., p.39 (1956b)

12) BOYLAND,E., D.M. WALLACE and D.C. WILLIAMS: Brit. J. Cancer 9, 62 (1955)

13) BOYLAND, E., J.E. GASSON and D.C. WILLIAMS: Brit. J. Cancer 11, 120 (1957)

14) HOLSTI, L.R. and P. ERMALA: Cancer 8, 679 (1955)

15) LILIENFELD, A., M. LEVIN and G.E. MOORE: AMA Arch. int. Med. 98, 129 (1956)

16) DENOIX, P. and D. SCHWARTZ: Bull. Cancer 43, 387 (1956)

17) LOCKWOOD, K.: Acta path. microbiol. scand. Suppl. 145, 51, (1966)

18) WYNDER, E.L., J. ONDERDONK and N. MANTEL: Cancer 16, 1388 (1962)

19) COBB, B.G. and J.S. ANSELL: J. Amer. Med. Ass. 193, 329 (1965)

20) DORN, H.F.: Acta Un. int. Cancer 18, 553 (1962)

21) KAHN, H.A.: Natn. Cancer inst. Monogr. No. 19, 1 (1966)

22) HAMMOND, E.C.: Natn. Cancer Inst. Monogr. No.19, 127 (1966)

23) WYNDER, E.L., F.R. LEMON and I.J. BROSS: Cancer 12, 1016 (1959)

24) LEMON, F.R., R.T. WALDEN and R.W. WOODS: Cancer 17, 486 (1964)

25) KERR, W.K., M. BARKIN, P.E. LEVERS, S.K.C. WOO and Z. MENCZYR: Canad. med. Ass. J. 93, 1 (1965)

26) WISS, O.: Z. Naturfosch. 7b, 133 (1952)

27) DALGLIESH, C.E., W.E. KNOX and A. NEUBERGER: Nature 168, 20 (1951)

28) WISS, O. u. F. WEBER: H. 304, 232 (1956)

29) NEURATH, G., W. DONTENWILL, M. HÄUSERMANN, P. WALTZ, J.F. GRAHAM: in: Nikotin-Pharmakologie und Toxikologie des Tabakrauches, H. SCHIEVELBEIN Herausgeber, Thieme Verlag, Stuttgart 1968

30) JAKOBY, W.B., and D.M. BONNER: J. biol. Ch. 205, 699 (1953)

31) ALDRIDGE, W.N.: Analyst 69, 262 (1944)

32) LANG, S.: Biochem. Z. 259, 243 (1933), 263, 262 (1933)

33) GINOULHIAC, E. e L.T. TENCONI: Boll. Soc. ital. Biol. sper. 35, 1801 (1959)

34) KNOX,W.E. and V.H. AUERBACH: J. biol. Ch. 214, 307 (1955)

35) TANAKA, T. and W.E. KNOX: J. biol. Ch. 234, 1162 (1959)

36) KNOX, W.E.; in: Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol. Vol. II, S. 242

37) WISS, O.: Helv. 32, 1694 (1949)

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich für die Überlassung des Themas und den Arbeitsplatz im Klinisch-chemischen Institut.

Für die zahlreichen Anregungen und die unermüdliche Hilfe bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Priv. Doz. Dr. H. Schievelbein.

Den Mitarbeitern des Instituts, besonders Fräulein Dorlis Bruns und Fräulein Karin Löschenkohl sage ich für Ihre freundliche Unterstützung vielen Dank.

L e b e n s l a u f

Mein Name ist Helmut Grumbach. Am 23.5.1942 wurde ich in Schwabach als 3. Kind des Dipl. Kaufmanns und Ingenieurs Wilhelm Grumbach und seiner Frau Margarete, geb. John, geboren.
Von 1948 - 1952 besuchte ich die Grundschule in Mühlhof bei Nürnberg; anschließend trat ich in das Alte Realgymnasium München ein, wechselte 1958 an das Realgymnasium Nürnberg, wo ich 1961 die Reifeprüfung ablegte. Nach einem Semester Maschinenbaustudium begann ich im Sommersemester 1962 an der Universität Würzburg Medizin zu studieren. An der Universität München absolvierte ich im Sommer 1968 das Staatsexamen.